

学校编码: 10384

学号: 24520131153510

分类号____密级____

UDC____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

MicroRNA186 靶向 YY1 和 CDK6 抑制前列腺癌细胞增殖和肿瘤生长

MicroRNA-186 inhibits prostate cancer cell proliferation
and tumor growth by targeting YY1 and CDK6

陆树

指导教师姓名: 白培明 教 授

专 业 名 称: 外 科 学

论文提交日期: 2016 年 04 月

论文答辩时间: 2016 年 05 月

学位授予时间: 2016 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2016 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

摘 要	1
Abstract	3
第一章 前言.....	5
1. MicroRNA	5
2. MicroRNA186.....	5
3. 前列腺癌	6
4. 前列腺癌与 miRNA	6
5. 本课题的研究内容和意义.....	7
第二章 材料和方法.....	8
1. 材料.....	8
1.1 主要材料和试剂.....	8
1.2 实验耗材和设备.....	11
2. 实验方法	13
2.1 重组质粒构建方法	13
2.2 RNA 相关实验.....	21
2.3 细胞相关实验.....	23
2.4 蛋白相关实验.....	27
2.5 小鼠相关实验.....	30
第三章 实验结果与分析	31
1. MiRNA186 在前列腺癌细胞中低表达	31
2. PCDH-miRNA186 载体的构建.....	32
2.1 MiRNA186 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳鉴定	32
2.2 重组质粒酶切琼脂糖凝胶电泳鉴定	33
2.3 重组质粒的测序鉴定	33
3. 高表达 miRNA186 抑制前列腺癌细胞增殖	34

4. 高表达 miRNA186 抑制前列腺癌细胞小鼠模型瘤球的形成	37
5. YY1, CDK6 是 miRNA186 的下游靶基因	39
第四章 讨论	42
第五章 结论	46
参考文献	47
中英文缩略词表	53
致 谢	55

Contents

Abstract in Chinese	1
Abstract in English	3
I Introduction	5
1. MicroRNA	5
2. MicroRNA186.....	5
3. Prostate cancer	6
4. Prostate cancer and microRNA.....	6
5. Aims, contents and significance of this project	7
II Materials and Methods	8
1. Materials	8
1.1 Main materials and reagents	8
1.2 Main consumables and equipments.....	11
2. Experimental methods	13
2.1 Plasmid construction.....	13
2.3 Protocols for RNA assays	21
2.3 Protocols for cell assays.....	23
2.4 Protocols for protein assays	27
2.4 Protocols for animal tumor formation assay.....	30

III Results and Analysis.....	31
1. The miR-186 expression was significantly decreased in the PCa cell lines	31
2. Results of plasmid construction	32
2.1 Test of PCR products	32
2.2 Digestion analysis of recombinant plasmid	32
2.3 Sequencing and BLAST analysis of recombinant plasmid ..	33
3. MiR-186 inhibits PCa cell growth <i>in vitro</i>	34
4. MiR-186 suppresses the tumor growth of PCa cells <i>in vivo</i>	37
5. MiR-186 inhibits YY1 and CDK6 expression by targeting their 3'-UTRs	39
IV Discussion	42
V Conclusion	46
References.....	47
Abbreviations	53
Acknowledgement	55

摘要

目的

目前的研究已经证实 miRNA186 在包括非小细胞肺癌、膀胱癌、胰腺导管癌等肿瘤中起着重要的调控作用，但是 miRNA186 与前列腺癌之间的关系目前还没有研究。本研究的目的主要是探究 miRNA186 对前列腺癌细胞生物学功能的影响，寻找 miRNA186 在前列腺癌细胞中作用的下游靶基因，探究其作用的机制。

方法

首先通过荧光定量 PCR 的方法检测 miRNA186 在前列腺上皮细胞和 3 种不同前列腺癌细胞之间的表达情况，然后构建高表达 miRNA186 的重组质粒载体，通过慢病毒转染和筛选获得稳定高表达 miRNA186 的前列腺癌细胞，荧光定量 PCR 检测其表达情况。通过体外的 CCK8 实验和流式细胞仪检测细胞周期实验来验证过表达 miRNA186 对前列腺癌细胞生物功能的影响，体内实验通过裸鼠肿瘤瘤球形成实验来验证过表达 miRNA186 对前列腺癌细胞成瘤能力的影响。在寻找靶基因实验中，结合数据库(Targetscan, miRanda, mirwalk, and Pictar)的预测结果，挑选 10 个可能的靶基因，首先通过荧光定量 PCR 检测这 10 个靶基因在过表达 miRNA186 的前列腺癌细胞和对照组细胞中的表达情况，挑选其中明显受到过表达 miRNA186 影响的靶基因，进行荧光素酶报告基因实验验证和 Western Blot 验证，寻找出 miRNA186 在前列腺癌中的靶基因。

结果

1) 荧光定量 PCR 结果显示 miRNA186 在前列腺癌细胞中明显地表达，在 PC-3 细胞中表达量最低。

2) CCK8 实验表明过表达 miRNA186 能够明显抑制细胞的增值能力，通过流式细胞仪检测细胞周期后发现，过表达 miRNA186 的前列腺癌细胞 PC-3 中，G1 期细胞数目明显变多，细胞分裂变慢。裸鼠肿瘤瘤球形成实验结果表明，过表达 miRNA186 能够明显抑制前列腺癌细胞 PC-3 的肿瘤瘤球的形成。

3) 荧光定量 PCR 结果表明，在过表达 miRNA186 的前列腺癌细胞 PC-3 中，

YY1, CDK6, MAP3K2 和 VEGFA 基因的表达受到明显抑制, 通过荧光素酶报告基因实验结果发现, 过表达 miRNA186 能够明显抑制 YY1 和 CDK6 基因的荧光素酶活性, 最后的 Western Blot 实验结果表明, YY1 和 CDK6 在过表达 miRNA186 的前列腺癌细胞中, 蛋白表达明显受到抑制。

结论

MiRNA186 在前列腺癌细胞中低表达, 过表达 miRNA186 能够明显抑制前列腺癌细胞的增殖能力和肿瘤瘤球的形成, 其作用的机制是通过直接与 YY1 和 CDK6 基因信使 RNA 的 3' UTR 区结合, 干扰 YY1 和 CDK6 表达, 抑制前列腺癌的发生与发展。通过以上研究结果, 也为临床上前列腺癌的诊断和治疗提供了一个新的靶点。

关键词

前列腺癌, miRNA186, YY1 和 CDK6。

Abstract

Objection

Recent studies demonstrated that miR-186 functions as a critical player in several cancers, including human non-small cell lung cancer, bladder cancer, pancreatic ductal adenocarcinoma, and so on. However, the functions of miR-186 in prostate cancer are still uncharted. Our study is to understand the functions of miR-186 in prostate cancer.

Methods

RT-PCR was used to define the expression of miR-186 in prostate cell lines. And then construct the miRNA186-containing plasmid, transfected the plasmid into PC-3 cells to generate miRNA186 overexpression stable cell lines. Then, the function of overexpress miRNA186 was detected by CCK8 assays and cell-cycle analysis in vitro, by tumor growth assays in nude mice in vivo. To determine the potential mechanism by which miR-186 suppress the tumor growth of PCa cells, four in silico algorithms(Targetscan, miRanda, mirwalk, and Pictar) were used to forecast target genes of miR-186, we used qRT-PCR to detect the expression of these potential targets genes in PC-3/pCDH or PC-3/miR-186. At last, Luciferase-reporter activity assay and western blot were used to test the results from qRT-PCR to find the target genes of miRNA186 in prostate cancer.

Results

- a) The miR-186 expression was significantly decreased in the PCa cell lines in comparison with RWPE-1, and in PC-3 was the lowest which was chosen for further overexpression study.
- b) CCK8 assays implied that the ectopic overexpression of miR-186 suppressed the proliferation of PC-3 cells. Furthermore, miR-186 overexpression increased the percentage of cells in the G0/G1 phase and decreased the percentage of cells in the S phase. In animal assay, the mice injected PC-3/miR-186 cells displayed obvious

smaller tumors compared with the mice injected with PC-3/pCDH cells.

c) The expression of YY1, CDK6, MAP3K2 and VEGFA were founded to be decreased more than 40% upon ectopic miR-186 overexpression in PC-3 cells. In luciferase-reporter activity assay, the overexpression of miR-186 conspicuously decreased the luciferase activity of YY1 and CDK6 by 40-45% respectively compare to controls. However, we also found that the mutant binding sites of miR-186 in the target genes YY1 and CDK6 3'UTRs abolished the miR-186-mediated inhibitory effect on the luciferase activity. The levels of YY1 and CDK6 were obviously decreased in PC-3/miR-186 cells compared with PC-3/pCDH cells in western blot.

Conclusion

Our data demonstrated that miR-186 is a novel tumor suppressor in the progression of prostate cancer. MiR-186 expression is inversely associated with the proliferation of PC-3 cells and tumor growth. MiR-186 might inhibits prostate cancer cell proliferation and tumor growth by targeting YY1 and CDK6. Thus, the mechanism of miR-186in PCa will provide new strategies to diagnose and treat PCa.

Key words

Prostate cancer, miRNA186, YY1 and CDK6.

第一章 前言

1. MicroRNA

MicroRNA 真核生物中一种小的非编码 RNA，长度约 18-22 个碱基，microRNA 可以通过与靶基因信使 RNA (mRNA) 的 3'端非翻译区 (3'UTR) 区结合从而调节 mRNA 的转录和转录后的蛋白表达^[1, 2]。MicroRNA 1993 年被第一次发现，Lee 和 Reinhart 等在秀丽虫幼虫发育的研究中发现了一种小的调控 RNA，并命名为 lin-4^[3]，后来相似的 RNA let-7 也在秀丽虫中被发现^[4]。随后的研究逐渐发现这类小 RNA 在基因表达和调控中具有重要的作用，并被命名为 microRNA^[5, 6]。

MicroRNA 最初的前体为 primary microRNA (pri-miRNA)，在细胞核中合成，长度约 300-1000 个碱基，pri-miRNA 经过核糖核酸酶 Drosha 加工后变为次一级的 microRNA 的前体 precursor microRNA (pre-miRNA)，pre-miRNA 长度约 70-90 个碱基，具有环状结构，然后 pre-miRNA 被转运蛋白从细胞核中运送到细胞质中，与 Dicer 酶结合后最终形成 20 个碱基左右的 microRNA^[7]。迄今的研究已经证实了 microRNA 的主要调控机制，主要是通过 3'非翻译区 (3'UTR) 互补结合，从而干扰基因转录翻译的过程，导致基因表达受阻，而有的 microRNA 还能作用于 5'非翻译区、启动子等进行调控^[8]。

MicroRNA 在肿瘤的发生发展过程中也具有着重要作用，Calin 等的研究首次发现了 microRNA 在白血病中存在异常表达^[9]；随后，大量其他表达异常的 microRNA 也被发现^[10]；进一步的研究还发现 microRNA 与肿瘤的细胞增殖、凋亡、肿瘤的转移都密切相关^[11, 12]。在肿瘤的发生发展过程中，microRNAs 既能以癌基因的角色调控抑癌基因，又能以抑癌基因的身份调控癌基因。并且大多数 microRNA 位于染色体的脆性区域，其表达水平容易受到各种因素的影响^[13]，因此极容易出现 microRNA 的异常表达，进而影响肿瘤的发生发展^[14]。

2. MicroRNA186

miRNA186，前体全长 86 个碱基，位于人染色体 1p31.1。MiRNA186 已经被发现在多种肿瘤的发展发展中扮演了重要的调控作用；Zhou 等研究发现 miRNA186

下调肿瘤促凋亡基因 P2X7^[15]；Myatt 等研究表明 miRNA186 抑制肿瘤抑制基因 FOXO1 的表达，促进了子宫内膜肿瘤的发生，提示了 miRNA186 潜在的作为癌基因的作用^[16]；然而另一方面，Guang hui 等在非小细胞肺癌的研究中发现，miRNA 可以通过靶向 ROCK1 基因，从而抑制小细胞肺癌的生长和转移^[17]；LvSQ 等发现在原发性神经管细胞瘤中 miRNA186 表达下调，暗示了 miR-186 可能还具抑癌基因的功能^[18]。在 Junchao 等的研究还发现 miRNA186 能够通过下调细胞周期相关蛋白 CCND1、CDK2，改变细胞周期，进而抑制非小细胞肺癌的发生与发展^[19]。

3. 前列腺癌

前列腺癌（prostate cancer, PCa）是泌尿外科最常见的肿瘤，也是威胁全球男性健康的重大问题。根据美国 2015 年癌症统计报告结果显示，2015 年美国前列腺癌新增病例约 220800 例，排在所有肿瘤的第三位，在男性肿瘤中排名第一位；2015 年死亡病例约 27540 例，仅次于肺癌在男性中排名第二^[20]。我国前列腺癌发病率远低于西方发达国家，但是近年来，由于经济的发展导致的生活方式的西方化、人口老龄化及前列腺癌特异性抗原（PSA）筛查在临床的普及，从 1998 年至 2008 年的十年间我国前列腺癌发病率年均增长比例高达 12.07%^[21]，前列腺癌已经逐渐成为我国最为常见的肿瘤之一。

前列腺癌早期临床表现通常无症状或无明显特异性症状，随着肿瘤的进展，可能出现下尿路梗阻或尿路刺激等症状。目前对于前列腺癌的治疗包括手术、化疗、生物治疗等方法，其中去势治疗（androgen deprivation therapy, ADT）在临床上的运用最为常用，但是随着治疗进行和前列腺癌的进展，患者晚期往往会发展为去势治疗抵抗的前列腺癌（castration resistant prostate cancer, CRPC），严重影响治疗效果和患者的预后^[22, 23]。CRPC 等问题已经成为目前前列腺癌治疗和研究中的难题，然而迄今为止，关于这方面的机制研究尚未取得突破性进展。

4. 前列腺癌与 miRNA

对于前列腺癌的发生和发展的确切原因我们尚不完全清除，目前的很多证据表明遗传因素在其中扮演着重要的作用^[24-28]。在前列腺癌与 miRNAs 的研究中，目前已经发现多种 miRNAs 在前列腺癌的发生发展中扮演者重要的作用；Yi Chen

等发现 miRNA221、miRNA222 在前列腺癌中明显高表达，抑制 miRNA221、miRNA222 的表达能够显著上调 ARHI 基因，抑制前列腺癌细胞的细胞增殖和侵袭，从而抑制前列腺癌的进展^[29]；Rika Nishikawa 等的研究发现，miRNA29s 作为一种抑癌基因，通过靶向 LAMC1 基因抑制了前列腺癌的转移^[30]；LaTanya 的研究结果表明 miRNA200b 的过表达能够明显抑制前列腺癌细胞的增殖和肿瘤瘤体的形成^[31]。除此之外，Kati 等发现了包括 miRNA186, miRNA26a 等在内多个 miRNAs 在正常前列腺组织和前列腺癌组织中表达存在明显差异，其中 miRNA186 在前列腺癌组织中的表达量相比较正常前列腺上皮和前列腺增生组织，表达明显下调^[32]；这暗示着异常表达的 miRNA186 可能在前列腺癌的发生发展中起着非常重要的调控作用。

5. 本课题的研究内容和意义

综上，我们可以发现 miRNAs 与前列腺癌的发生发展密切相关。MiRNA186 在前列腺癌组织中明显低表达，但是其具体机制还不清楚，揭示 miRNA186 与前列腺癌之间的关系及其潜在的机制能够为前列腺癌的研究提供一个很好的方向，也为前列腺癌诊断和治疗中提供了一个新的靶点。

本课题以正常的前列腺癌细胞系 PC-3 细胞和高表达 miRNA186 的 PC-3 细胞为模型，研究 miRNA186 在前列腺癌发生发展中的作用。我们首先检测了 miRNA186 在前列腺癌上皮细胞和不同前列腺癌细胞系之间的表达情况，进一步实验中，我们通过正常 PC-3 细胞和高表达 miRNA186 的 PC-3 细胞来研究 miRNA186 对于前列腺癌细胞增殖、细胞周期等的影响，我们还通过动物实验研究了高表达 miRNA186 对于前列腺癌细胞肿瘤形成的影响，最后通过荧光素酶报告基因实验分析 miRNA186 的潜在作用靶点和作用机制，明确 miRNA186 与前列腺癌之间的关系。

第二章 材料和方法

1. 材料

1.1 主要材料和试剂

293T 细胞株	购买自中国科学院上海细胞库
RWPE-1 细胞株	购买自中国科学院上海细胞库
PC-3 细胞株	购买自中国科学院上海细胞库
DU145 细胞株	购买自中国科学院上海细胞库
LNCap 细胞株	购买自中国科学院上海细胞库
裸小鼠	厦门大学实验动物中心代购寄养
pCDH-CMV-EF1 α -puro	美国 System Biosciences 公司
pMIR-reporter-luciferase	美国 Thermo Fisher 公司
pCMV-VSVG	Addgene
pMDL	Addgene
pRSV-REV	Addgene
感受态 DH5 α	北京全式金公司
无内毒素质粒大提试剂盒	天根生化科技（北京）有限公司
无内毒素质粒小提中量试剂盒	天根生化科技（北京）有限公司
DNA 纯化回收试剂盒	天根生化科技（北京）有限公司
胰蛋白胨（Tryptone）	天根生化科技（北京）有限公司
酵母提取物	天根生化科技（北京）有限公司
琼脂糖	天根生化科技（北京）有限公司
D2000 DNA maker	天根生化科技（北京）有限公司
GoldVIEW TM 核酸染料	东盛生物公司
氨苄青霉素（ampicillin）	北京索莱宝公司
限制性核酸内切酶 BamH I	美国 Thermo Fisher 公司

限制性核酸内切酶 Xba I	美国 Thermo Fisher 公司
限制性核酸内切酶 HindIII	美国 Thermo Fisher 公司
限制性核酸内切酶 Spe I	美国 Thermo Fisher 公司
Taq 酶底物预混液	日本 TOYOBO 公司
Luciferase Reporter Assay System	美国 Promega 公司
Trizol agent	上海 Invitrogen 公司
实时定量 PCR 试剂盒	上海 Invitrogen 公司
逆转录试剂盒 (RevertAid First StrandcDNA Synthesis Kit)	美国 Thermo Fisher 公司
miRNA 提取试剂盒	美国 OMEGA 公司
1640 培养基	美国 GIBCO 公司
胎牛血清 (FBS)	美国 GIBCO 公司
双抗 (青、链霉素)	美国 GIBCO 公司
PBS 磷酸缓冲液	北京索莱宝公司
RIPA 裂解液 (强)	碧云天生物技术有限公司
PMSF	碧云天生物技术有限公司
Puromycin	InvivoGen 公司
CCK8 试剂盒	日本同仁公司
AP (过硫酸胺)	美国 Sigma 公司
DMSO	美国 Sigma 公司
考马斯亮蓝 G-250	美国 Sigma 公司
阿霉素	美国 Sigma 公司
脱脂奶粉	中国伊利公司
5×蛋白上样缓冲液	北京索莱宝公司
30%丙烯酰胺	北京索莱宝公司
Tween-20	北京索莱宝公司
TEMED	上海生工生物工程有限公司
DEPC 水	北京索莱宝公司

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.